

RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

PARIS

(11) N° d publication :

**2 362 156**

(A n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction).

A1

**DEMANDE  
DE BREVET D'INVENTION**

(21)

**N° 77 25051**

(54)

Substances contenant un allergène.

(51)

Classification internationale (Int. Cl.<sup>2</sup>). C 07 G 17/00; A 61 K 39/00.

(22)

Date de dépôt ..... 16 août 1977, à 15 h 37 mn.

(33) (32) (31)

Priorité revendiquée : *Demande de brevet déposée en Grande-Bretagne le 17 août 1976, n. 34.114/1976 et complétée le 9 juin 1977 aux noms de Weng Yek Lee et Alec Sehon.*

(41)

Date de la mise à la disposition du  
public de la demande .....

B.O.P.I. — «Listes» n. 11 du 17-3-1978.

(71)

Déposant : Société dite : PHARMACIA AB., résidant en Suède.

(72)

Invention de :

(73)

Titulaire : *Idem* (71)

(74)

Mandataire : Cabinet Plasseraud.

La présente invention concerne de nouvelles substances contenant un allergène, utiles comme immunosuppresseurs spécifiques de la production des réagines (anticorps réaginique) dirigées contre l'allergène en question. L'invention concerne également un procédé pour préparer ces nouvelles substances contenant un allergène.

L'invention concerne également l'emploi de conjugués tolérogènes d'allergènes et de polymères non immunogènes solubles dans l'eau (tels que des polyéthylèneglycols) pour l'immunosuppression spécifique des allergies courantes de "type immédiat" chez les mammifères, y compris l'homme, dont les médiateurs sont des réagines de la catégorie IgE.

Environ 15 % de la population des pays développés souffrent d'allergies à l'égard de substances apparemment inoffensives de leur environnement telles que des substances inhalées (par exemple des pollens, des poussières et des plumes responsables de l'asthme allergique et du rhume des foins), divers aliments, la laine, des médicaments, etc. Les patients allergiques, contrairement aux individus normaux, produisent des réagines contre les constituants antigéniques (allergisants) présents dans ces substances.

Généralement le terme antigène désigne une substance capable de provoquer une réponse immunitaire et c'est également généralement la substance que l'on utilise pour la détection des anticorps correspondants selon les nombreuses déterminations immunologiques in vitro et in vivo permettant la mise en évidence des interactions antigènes-anticorps. De façon semblable on utilise le terme allergène pour désigner un antigène capable de produire des réagines et de se combiner avec elles ; cependant cette définition n'exclut pas la possibilité que les allergènes puissent produire des anticorps de catégorie autre que l'IgE. Dans la présente description le terme "antigénicité" est la capacité d'un antigène ou d'un allergène à se combiner in vitro avec les anticorps correspondants ; le terme "allergénicité" ou activité cutanée est la capacité d'un allergène à se combiner in vivo avec les réagines homologues pour déclencher une anaphylaxie générale ou systémique ou des réactions cutanées locales, soit dans des tests cutanés directs, soit dans des réactions anaphylactiques cutanées passives (PCA) et le terme "immunogénicité" désigne, selon une acception limitée, la capacité que présentent un antigène ou un

allergène à provoquer in vivo la formation d'un anticorps spécifique correspondant. Le terme "tolérogénicité" est la capacité que présente une substance contenant un allergène à supprimer pratiquement in vivo et de façon spécifique la réponse immunitaire à l'allergène original non modifié correspondant; dans le présent contexte, le terme "tolérogène" et le terme immunosuppresseur sont interchangeables.

Les réagines présentent la propriété caractéristique parmi toutes les immunoglobulines de se fixer aux mastocytes tissulaires et aux basophiles des individus qui produisent activement ces anticorps ou des individus auxquels on a injecté un sérum allergisant. La réticulation des molécules d'anticorps de type IgE fixées à ces cellules par l'allergène approprié déclenche la dégranulation de ces cellules, qui est suivie de la libération d'agents pharmacologiques vaso-actifs par les granules tels que l'histamine, la bradykinine, la substance à réaction lente de l'anaphylaxie (SRS-A), le facteur chimiotactique de l'anaphylaxie, des éosinophiles (ECF-A) et le facteur d'activation des plaquettes. Ces composés produisent les symptômes allergiques, c'est-à-dire des réactions générales ou des réactions inflammatoires locales, en agissant sur les vaisseaux sanguins et les muscles lisses ; dans les cas graves ces réactions peuvent conduire à une anaphylaxie.

Les modes thérapeutiques couramment utilisés comprennent une série prolongée d'injections de l'allergène agressif pendant plusieurs années et l'on doit effectuer des administrations à très faibles doses en raison du caractère allergisant propre des produits naturels et du risque de déclenchement de réactions anaphylactiques générales.

Donc pour effectuer un traitement sûr et efficace, il est essentiel de produire des dérivés des allergènes naturels capables d'agir comme tolérogènes, en supprimant fortement sinon totalement la formation d'anticorps de type IgE de façon immunospecifique. De plus ces dérivés tolérogènes doivent présenter deux propriétés additionnelles : (1) ils doivent être non allergisants c'est-à-dire qu'ils ne doivent pas être capables de se combiner in vivo avec les anticorps de type IgE fixés aux mastocytes et aux basophiles et par conséquent ils ne doivent pas être capables de déclencher des réactions anaphylactiques et (2) ils doivent être non immunogènes, c'est-à-dire qu'ils ne doivent pas être

capables de provoquer une réponse immunitaire vis-à-vis d'eux-mêmes à la suite d'injections répétées.

La demanderesse a découvert que l'on peut atteindre ces objectifs en transformant des allergènes immunogènes (tels que l'ovalbumine (OA), les constituants non dialysables de l'extrait aqueux du pollen de jacobée (RAG) et l'albumine de chien) en dérivés tolérogènes qui sont également pratiquement non immunogènes (lorsqu'on les administre sans adjuvant) et non allergisants par couplage par covalence à ces allergènes de polymères non immunogènes solubles dans l'eau.

Par conséquent l'invention concerne des substances contenant un allergène utiles comme immunosuppresseurs spécifiques de la production des réagines dirigées contre l'allergène en question, ces substances étant des conjugués covalents des molécules d'allergène et de polymères non immunogènes solubles dans l'eau, le degré de conjugaison étant tel que les conjugués soient rendus tolérogènes et pratiquement non allergisants et non immunogènes.

L'invention concerne également un procédé pour préparer ces substances contenant un allergène, selon lequel on unit par covalence des polymères non immunogènes solubles dans l'eau aux molécules d'allergène dans une mesure telle que les conjugués obtenus soient rendus tolérogènes et pratiquement non allergisants et non immunogènes.

L'invention concerne également l'emploi de substances contenant un allergène dans un procédé de suppression de la formation des réagines dirigées contre l'allergène en question chez les mammifères (y compris l'homme) sensibles à ces allergènes, dans lequel on injecte à une dose thérapeutique efficace les substances contenant un allergène précédemment définies à ces mammifères sous une forme convenant en pharmacie.

Les polyéthylèneglycols et en particulier ceux ayant un poids moléculaire d'environ 2.000 à 35.000 se sont révélés très utiles comme polymères non immunogènes solubles dans l'eau servant à préparer les substances contenant un allergène précitées. Le terme polyéthylèneglycols dans le contexte présent englobe les dérivés convenant en physiologie tels que les monoéthers alkyliques inférieurs, de préférence l'éther monométhylque, dont on utilise de façon pratique les radicaux hydroxy terminaux pour le couplage.

On peut également utiliser d'autres polymères non immunogènes solubles dans l'eau tels que les alcools polyvinyliques, les polyvinylpyrrolidones, les polyacrylamides et les homopolymères d'acides-amino.

5 On peut utiliser, pour effectuer le couplage par covalence de ces polymères aux molécules d'allergène, tous les procédés de couplage des matières à activité biologique et des polymères inertes normalement utilisés. Ces procédés sont par exemple le couplage avec un anhydride mixte, le chlorure cyanurique, un  
10 isothiocyanate et la réaction entre des dérivés de type -SH et des dérivés de type -CH<sub>2</sub>I. Cependant il est évident que le spécialiste peut concevoir d'autres procédés aboutissant au couplage désiré.

On effectue la réaction de couplage entre les groupes  
15 actifs des molécules d'allergène et des molécules de polymère. S'il est nécessaire on doit introduire ces groupes dans les molécules avant la réaction de couplage. Ces groupes actifs sont par exemple -NH<sub>2</sub>, -NCS, -SH, -OH, -CH<sub>2</sub>I et -COOH et on peut les introduire selon des procédés bien connus s'ils ne sont pas préalablement présents dans les molécules. Comme précédemment indiqué  
20 on effectue le couplage du polymère à l'allergène dans une mesure telle que la substance obtenue soit tolérogène (immunosuppressive) et pratiquement non allergisante et non immunogène. Le degré de conjugaison des molécules de polymère à la molécule d'allergène permettant d'obtenir ce résultat varie d'un allergène à l'autre.  
25 Cependant le spécialiste peut facilement obtenir dans chaque cas la conjugaison nécessaire en préparant une série de conjugués ayant des degrés de conjugaison différents et en établissant la gamme particulière dans laquelle les conditions précitées sont  
30 remplies. Un trop faible degré de conjugaison produit des conjugués allergisants et immunogènes et un degré trop élevé de conjugaison produit des conjugués qui ne sont pas tolérogènes.

L'invention permet de préparer des dérivés tolérogènes de pratiquement tous les allergènes responsables des formes  
35 courantes d'allergie chez l'homme et les mammifères. Ces allergènes dérivent par exemple d'animaux (en particulier d'animaux domestiques tels que des chiens, des chats, des vaches, des chevaux, etc.) de pollens de différentes herbes et arbres, de venins d'insectes, d'aliments, de poussières de maison, de mites et de  
40 moisissures.

On utilise de préférence les substances contenant un allergène selon l'invention sous forme de solutions dans du soluté salé ou dans un tampon convenant en physiologie. On peut administrer ces solutions par voie parentérale et de préférence on les administre par voie intraveineuse ou intramusculaire. On peut répéter les administrations à des intervalles appropriés.

On peut conserver les substances contenant un allergène sous une forme lyophilisée.

L'invention sera mieux comprise à la lecture des exemples non limitatifs et des tableaux suivants et à l'examen des dessins annexés dans lesquels les figures 1 et 2 représentent des diagrammes de résultats expérimentaux obtenus selon l'invention.

#### Matières et procédés

##### 15 Animaux

On utilise des souris consanguines de 8 à 12 semaines ( $C_{57}BL/6 \times DBA/2$ ) $F_1$  (appelées  $B_6D_2F_1$ ) et des rats non consanguins d'élevage fournis par North American Laboratories Supply Company, Gunton, Manitoba.

##### 20 Préparation des conjugués haptène-protéine

On utilise pour la synthèse des conjugués  $DNP_3$ -OA et  $DNP_{18}$ -BGG de l'ovalbumine (OA) et des  $\gamma$ -globulines bovines (BGG) fournies respectivement par Nutritional Biochemicals Co., Cleveland, Ohio et Calbiochem, San Diego, Californie, et on effectue la synthèse par réaction avec du dinitro-2,4-benzènesulfonate de sodium (DNBS) en solution dans du carbonate disodique 0,2 M. On prépare l'extrait dinitro-2,4 phénylé d'*Ascaris suum* (DNP-Asc) renfermant  $6,5 \times 10^{-8}$  M de DNP par mg d'Asc, en faisant réagir 46 mg d'Asc avec 24 mg de DNBS, en présence de 46 mg de carbonate disodique dans un volume total de 5,5 ml d'eau distillée à 37°C pendant 2 heures. On élimine l'haptène n'ayant pas réagi par filtration sur gel avec une colonne de Sephadex® G-25 (dextrane réticulé par l'épichlorhydrine, de Pharmacia Fine Chemicals AB, Suède).

##### 35 Immunisation et mesure des réponses immunitaires

Pour obtenir les réponses optimales d'IgE anti-DNP et anti(OA), on injecte par voie intrapéritonéale aux souris une faible dose standard de 1  $\mu$ g de  $DNP_3$ -OA en suspension avec 1 mg d'hydroxyde d'aluminium fraîchement préparé dans 0,5 ml de tampon phosphate tamponné (PBS). Cette dose administrée par voie intra-

péritonéale est appelée ci-après dose sensibilisatrice.

On provoque la réponse optimale d'IgE spécifique vis-à-vis des allergènes du pollen de jacobée (RAG) chez la souris par injection intrapéritonéale, en présence de 1 mg de trioxyde d'aluminium dans 10 µg de RAG ou d'AgE qui est un des composants purifiés du RAG; l'AgE est fourni par Worthington Biochemical Corporation, Freehold, New Jersey. On sensibilise également des souris avec 10 µg de DNP-Asc préalablement mélangé à 1 mg d'hydroxyde d'aluminium dans 0,5 ml de PBS pour produire les anticorps IgE anti-DNP et anti-Asc. On traite de façon identique des groupes de 5 souris et on regroupe les sérums des souris de chaque groupe pour déterminer le titre moyen en réagine selon la détermination de l'anaphylaxie cutanée passive (PCA). Le point final du titrage est l'inverse de la dilution maximale de chaque sérum provoquant une réaction de 5 mm de diamètre. Les titres de PCA de chaque sérum contenant la réagine pour des rats différents sont reproductibles dans la limite d'un facteur de 2; tous les titres de PCA indiqués sont la moyenne de deux déterminations. On détermine la coexistence des anticorps des catégories d'immunoglobulines autres que les réagines dans les sérums des souris immunisées par hémagglutination passive (HA).

On considère que la sensibilité de ces déterminations convient pour la présente étude, car elle donne un titre d'HA de l'ordre de 1.000 avec un sérum de lapin standard anti-DNP utilisé comme témoin pour chaque détermination d'HA.

Pour déterminer la réponse optimale anti-DNP et anti-OA des rats Chester Beatty, on injecte à ces animaux, par voie intrapéritonéale, 1 µg de DNP<sub>3</sub>-OA dans 0,5 ml de PBS en suspension avec 1 mg d'hydroxyde d'aluminium fraîchement préparé à 10<sup>10</sup> organismes d'un vaccin à base de Bordetella pertussis (Connaught Laboratories, Toronto). On mesure les titres des anticorps IgE produits chez le rat et la souris par détermination de l'anaphylaxie cutanée passive (PCA) chez des rats non consanguins.

#### Transfert cellulaire adoptif

On transfère des cellules spléniques de souris sensibilisées et rendues tolérantes à des receveurs congénitaux syngéniques irradiés par les rayons X (550 R) et on injecte aux receveurs la dose sensibilisante standard d'antigène en présence d'hydroxyde d'aluminium dans les 4 heures suivant le transfert cellulaire.

Exemples 1 et 2

On couple deux lots de polyéthylèneglycol (PEG de Baker Chemical Co. Phillipsburg, New-Jersey) ayant des poids moléculaires moyens de 6000 et de 20.000, qu'on appelle ci-après respectivement PEG<sub>6</sub> et PEG<sub>20</sub>, à de l'OA et à du RAG en utilisant le chlorure cyanurique comme agent de couplage selon un procédé semblable à celui décrit par R.Sharon et coll, J.Immunol.114/1585 (1975).

On prépare les conjugués OA-PEG<sub>6</sub> et OA-PEG<sub>20</sub> de la façon suivante : on mélange 0,4 g de l'un ou l'autre PEG dissous dans 6 ml d'hydroxyde de sodium 0,5 N à 0,1 g d'OA dans 5 ml de PBS et on ajoute à ce mélange, en agitant de façon constante, une solution de chlorure cyanurique (0,2 g dans 3 ml de N,N'-diméthylformamide). On laisse la réaction se poursuivre en agitant à la température ordinaire pendant 2 heures, puis pendant 24 heures à 4°C. On dialyse ensuite le mélange réactionnel contre du PBS pour éliminer le chlorure cyanurique n'ayant pas réagi et on concentre sous pression réduite à un volume de 5 à 7 ml. On isole ensuite les conjugués du PEG et de l'OA libres par filtration sur une colonne de Sepharose<sup>®</sup> 4B de Pharmacia Fine Chemicals AB, Suède, en utilisant du tampon salé boraté (BBS) comme agent d'élution. Les conjugués OA-PEG sont présents essentiellement dans les fractions correspondant au volume vide de la colonne; on recueille ces fractions et on les concentre.

Le procédé de préparation des conjugués RAG-PEG<sub>6</sub> et RAG-PEG<sub>20</sub> est semblable à celui décrit pour les conjugués OA-PEG, le mélange réactionnel étant constitué de 0,1 g de PEG<sub>6</sub> ou de PEG<sub>20</sub> dans 2 ml d'hydroxyde de sodium 0,5 N, 40 mg de RAG dans 5 ml de PBS et 80 mg de chlorure cyanurique dans 1 ml de N,N'-diméthylformamide. On isole également les conjugués RAG-PEG par filtration sur une colonne de Sepharose<sup>®</sup> 4B, comme précédemment décrit.

Expériences biologiquesI. Système DNP-OA

35 (A) Suppression de la formation de réagine avec les conjugués OA-PEG

Pour évaluer l'effet du conjugué OA-PEG<sub>6</sub> sur la formation de réagine, on injecte par voie intraveineuse 1 mg d'OA-PEG<sub>6</sub> à des souris, 4 heures avant de les immuniser avec la dose sensibilisatrice standard de 1 µg de DNP<sub>3</sub>-OA dans l'hydroxyde d'aluminium au jour zéro. Les souris reçoivent par voie intrapéritonéale



une seconde injection de l'antigène immunisant le 28ème jour, sans administration ultérieure du conjugué. Un groupe de souris témoins reçoit du PBS au lieu du conjugué. La figure 1 représente schématiquement les réponses des réagines pour l'haptène et le support, les titres de PCA étant représentés sur l'axe vertical, tandis que le temps, exprimé en semaines, est représenté sur l'axe horizontal. Les deux courbes supérieures correspondent au groupe témoin, tandis que les deux courbes inférieures correspondent au groupe d'essai. Les courbes en traits pleins correspondent à l'anti-DNP, tandis que les courbes en pointillés correspondent à l'anti-OA. Comme le montre la figure 1, le groupe témoin présente des réponses primaires maximales d'IgE pour l'haptène et le support, 14 jours après la sensibilisation et des réponses secondaires d'IgE anti-DNP et anti-OA nettement accrues apparaissent 7 jours après la seconde injection de la dose sensibilisatrice de DNP-OA qu'on administre 4 semaines après l'immunisation primaire. D'autre part le traitement des souris avec une injection unique d'OA-PEG<sub>6</sub> au jour zéro provoque une suppression complète des réponses primaires d'IgE pour le DNP et l'OA et l'immunisation secondaire de ces souris s'accompagne de réponses d'IgE faibles correspondant à environ 10 % de celles notées pour les animaux témoins. On voit donc que le traitement des souris avec l'OA-PEG<sub>6</sub> provoque une suppression prolongée des cellules auxiliaires T-OA-spécifiques impliquées dans la réponse à la DNP-OA.

Pour déterminer si l'effet suppresseur observé de l'OA-PEG<sub>6</sub> est immunospécifique, on injecte à des souris, par voie intraveineuse, 1 mg de PEG<sub>6</sub>, 4 heures avant qu'elles reçoivent la dose sensibilisatrice de DNP-OA. Pour un autre groupe de souris, on remplace le PEG<sub>6</sub> par le PEG<sub>20</sub>. Comme il est habituel, les souris témoins ne reçoivent que la dose sensibilisatrice de DNP-OA. Toutes les souris reçoivent au 20ème jour une seconde dose sensibilisatrice de DNP-OA. Il ressort de façon évidente des résultats figurant dans le tableau I que ni le PEG<sub>6</sub> ni le PEG<sub>20</sub> n'affectent la capacité de production de réagine des animaux et on peut donc conclure que la suppression provoquée par l'OA-PEG<sub>6</sub> est spécifique de l'antigène couplé au PEG<sub>6</sub>.

(B) Spécificité de l'immunosuppression provoquée par l'OA-PEG<sub>6</sub>

Pour apporter une preuve complémentaire de la spécificité de la suppression observée des anticorps IgE, on administre à des souris, au jour zéro, une injection intraveineuse de 0,8mg

d'OA-PEG<sub>6</sub>, 4 heures avant administration intrapéritonéale de 1 µg de DNP-OA ou de 10 µg de DNP-Asc dans le trioxyde d'aluminium. Au 28ème jour on administre à ces animaux une seconde injection intrapéritonéale des mêmes antigènes dans l'hydroxyde d'aluminium.

5 On utilise dans cette expérience deux groupes témoins de souris ne recevant pas d'OA-PEG<sub>6</sub>, c'est-à-dire un groupe recevant deux doses sensibilisatrices de DNP-OA aux jours zéro et 28 et l'autre groupe recevant deux doses de 10 µg de DNP-Asc dans l'hydroxyde d'aluminium, les mêmes jours.

10 Les résultats regroupés dans le tableau II confirment la spécificité de la suppression des réponses d'IgE vis-à-vis du DNP et de l'OA par administration intraveineuse d'OA-PEG<sub>6</sub>. On voit donc que les souris traitées par l'OA-PEG<sub>6</sub> (essai A) ne présentent pas de réponse primaire d'IgE vis-à-vis du DNP ou de l'OA  
15 lorsqu'elles sont sensibilisées au DNP-OA et que la réponse secondaire au DNP-OA est nettement inférieure à celle des animaux témoins. D'autre part le traitement des souris par le conjugué OA-PEG<sub>6</sub> n'altère pas leur capacité à présenter une réponse d'anticorps IgE vis-à-vis de l'antigène non apparenté qu'est le DNP-Asc,  
20 c'est-à-dire qu'il n'y a pas de différence significative des titres d'anticorps IgE anti-DNP et anti-Asc dans les sérums des souris du groupe témoin B et du groupe d'essai B.

(C) Capacité présentée par les conjugués OA-PEG de supprimer une réponse de réagine en cours

25 Cette expérience a pour but d'étudier la possibilité de supprimer par administration de conjugués d'OA-PEG une réponse de réagine en cours que l'on a établie au moins 5 semaines avant de tenter de la supprimer. Les protocoles d'injection et les titres de PCA des sérums figurent dans le tableau 3. Ces valeurs  
30 montrent qu'alors qu'une réponse prolongée et accrue d'IgE au DNP et à l'OA peut persister pendant 82 jours dans un groupe de souris témoins ayant reçu une seconde et une troisième doses sensibilisatrices de DNP aux jours 40 et 68, l'administration de  
35 trois injections intraveineuses journalières de 0,8 mg d'OA-PEG<sub>6</sub> aux jours 37, 38 et 39 aux souris sensibilisées provoque une diminution très nette de la capacité que possèdent ces animaux à présenter une réponse d'IgE anti-DNP et anti-OA après des injections secondaires et tertiaires.

Pour prouver que l'OA-PEG<sub>20</sub> est capable de supprimer  
40 une réponse de réagine en cours vis-à-vis de la DNP-OA, on admi-

nistre le 22ème jour à des souris sensibilisées le jour 0 à la DNP-OA, une injection de 1 mg de OA-PEG<sub>20</sub> et une injection intrapéritonéale de rappel de la dose sensibilisatrice de DNP-OA au jour 28. Le groupe de souris témoins ne reçoit que les deux injections sensibilisatrices de DNP-OA aux jours zéro et 28. Comme le montre le tableau IV, le traitement par l'OA-PEG<sub>20</sub> des souris sensibilisées provoque une diminution très nette des réponses de réagine vis-à-vis du DNP et de l'OA.

Il convient de souligner que les titres d'IgE anti-OA des souris, dans les deux jours suivant l'administration d'OA-PEG<sub>6</sub> ou d'OA-PEG<sub>20</sub> (c'est-à-dire au jour 24) ne sont pas modifiés par rapport aux teneurs des réagines des sérums des animaux témoins. Ceci indique que la modification de l'OA par conjugaison avec le PEG provoque un masquage ou une altération nette des déterminants de l'OA modifiée, car sinon on pourrait s'attendre à ce que les réagines persistant dans les sérums des animaux sensibilisés 24 jours au préalable aient été neutralisées par l'injection de la dose relativement importante des conjugués OA-PEG. Les expériences indiquées ci-après prouvent que cette interprétation est correcte.

(D) Maintien de l'absence de réaction dans le transfert adoptif

On immunise tous les donneurs de cellules spléniques avec une dose sensibilisatrice de DNP-OA, 45 jours avant de les sacrifier. Neuf jours avant le prélèvement des rates, on divise les animaux en trois groupes et chaque groupe reçoit une dose intraveineuse de 0,2 mg d'OA-PEG<sub>6</sub> dans 0,5 ml de PBS, ou 0,8 mg d'OA-PEG<sub>6</sub> dans 0,5 ml de PBS, ou seulement 0,5 ml de PBS. On sacrifie ensuite tous les animaux et on transfère aux récepteurs, qui sont des souris congénitales (syngéniques) ayant reçu une irradiation par les rayons X (550 R), une suspension de  $5 \times 10^7$  cellules spléniques de chacun des trois groupes. Moins de 4 heures après le transfert cellulaire, on administre à tous les receveurs une dose sensibilisatrice intrapéritonéale de DNP-OA et on suit les titres en IgE anti-DNP et anti-OA pendant deux semaines.

Comme le montre le tableau V, les teneurs en réagine ne sont que légèrement abaissées dans les 5 jours qui suivent l'injection d'OA-PEG<sub>6</sub> aux souris sensibilisées intactes, qui sont destinées à être sacrifiées pour le transfert cellulaire. Cependant après le transfert adoptif, les cellules spléniques des souris d'étude que l'on a traitées avec l'OA-PEG<sub>6</sub> répondent très mé-

diocrement à une dose sensibilisatrice additionnelle de DNP-OA que l'on a administrée aux receveurs irradiés par les rayons X, comparativement aux cellules spléniques des souris du groupe témoin. On peut donc conclure que le traitement des souris sensibilisées avec l'OA-PEG<sub>6</sub> supprime la capacité des cellules spléniques de ces animaux à produire des réagines lorsqu'on les réexpose à une dose sensibilisatrice additionnelle de l'antigène après le transfert adoptif.

5  
10 (E) Suppression des anticorps hémagglutinants avec les conjugués OA-PEG

En plus des effets supprimeurs des conjugués OA-PEG sur la formation des réagines, on a étudié l'effet de ces conjugués sur la formation des anticorps hémagglutinants. Pour cela les souris reçoivent une injection intraveineuse de 0,2 mg ou de 1,0 mg d'OA-PEG<sub>6</sub> ou d'OA-PEG<sub>20</sub> 4 heures avant l'administration de la dose sensibilisatrice de DNP-OA et toutes les souris reçoivent une seconde injection de la dose sensibilisatrice 28 jours après. Comme l'indiquent les résultats du tableau VI, aucune des deux préparations d'OA-PEG n'a un effet significatif sur les titres d'hémagglutination à la dose de 0,2 mg. Cependant l'administration des préparations d'OA-PEG à la dose plus élevée de 0,8 mg provoque un abaissement faible, mais significatif, des anticorps hémagglutinants et cet effet est plus marqué sur les anticorps hémagglutinants anti-DNP que sur les anticorps hémagglutinants anti-OA. Ces résultats permettent de conclure que les conjugués OA-PEG ont un effet supprimeur plus prononcé sur les cellules impliquées dans la production des anticorps IgE que dans la production des anticorps IgM et/ou IgG.

25  
30 II. Systèmes allergisants dérivant de la jacobée.

(F) Suppression de la production de réagines en réponse à l'administration de RAG.

On a démontré que la production de réagines correspondant au RAG chez la souris B<sub>6</sub>D<sub>2</sub>F<sub>1</sub> était optimale pour l'administration de 10 µg de RAG en suspension dans 1 mg d'hydroxyde d'aluminium dans 0,5 ml de PBS. Donc dans les expériences décrites ci-après, la dose sensibilisatrice standard pour produire les réagines correspondant à l'allergène de la jacobée consiste en 10 µg de RAG mélangé à 1 mg d'hydroxyde d'aluminium dans 0,5 ml de PBS. Pour tenter de supprimer une réaction de production établie de réagines correspondant au RAG, on administre à des souris sensi-

bilisées, au 15ème jour, 0,8 mg de RAG-PEG<sub>6</sub> ou de RAG-PEG<sub>20</sub>. Les résultats des essais sont illustrés par la figure 2 dans laquelle le titre d'anti-RAG déterminé par PCA est représenté sur l'axe vertical alors que le temps, exprimé en semaines, est représenté sur l'axe horizontal. La courbe en trait continu représente le groupe témoin, la courbe en pointillés le groupe ayant reçu le RAG-PEG<sub>20</sub> et la courbe en traits et points le groupe ayant reçu le RAG-PEG<sub>6</sub>. Comme le montre la figure 2, le traitement avec l'un ou l'autre de ces conjugués de RAG-PEG provoque une diminution des anticorps IgE anti-RAG et la teneur en anticorps IgE continue à s'abaisser malgré l'administration de la seconde dose sensibilisatrice de RAG au jour 21; au contraire les animaux témoins présentent une réponse secondaire typique.

On a démontré la spécificité de l'effet suppresseur des conjugués de RAG-PEG sur la réponse de production de réagines anti-RAG dans l'expérience figurant dans le tableau VII. Alors que l'administration d'une seconde dose sensibilisatrice de RAG au jour 34 après l'immunisation primaire à des souris qui ont reçu de l'OA-PEG<sub>6</sub>, du RAG ou du PBS par voie intraveineuse le jour 33, provoque un accroissement de la réponse d'IgE (le titre d'anti-RAG déterminé par PCA est de l'ordre de 500), l'administration de la seconde dose sensibilisatrice le jour 34 à des animaux ayant reçu la veille du RAG-PEG<sub>6</sub> s'accompagne d'une diminution considérable du titre des réagines anti-RAG (le titre d'anti-RAG déterminé par PCA s'abaisse à 60). De plus le fait que l'administration de 500 µg de préparation de RAG non conjugué sans hydroxyde d'aluminium le jour 33 ne gêne pas la réponse secondaire mise en évidence le jour 41 (qui est le résultat de la réinjection aux animaux de la seconde dose sensibilisatrice de RAG le jour 34) indique que la chute de la teneur en anticorps IgE anti-RAG précédemment observée n'est pas due à la neutralisation des anticorps IgE par le conjugué injecté, mais une modulation du système immunologique des animaux conduisant à une suppression spécifique de la réponse d'IgE anti-RAG. Il convient de noter que l'administration intraveineuse de 800 µg de RAG au 28ème jour (c'est-à-dire le jour où l'on administre aux animaux la seconde dose d'antigène sensibilisante) provoque une diminution du titre secondaire d'anti-RAG déterminé par PCA au 35ème jour à environ 20, qui peut être due à la neutralisation des anticorps IgE circulants; cependant même ces animaux ne présentent aucun signe d'immunosuppression car l'immunisation ultérieure au 36ème jour avec une troisième dose sensibilisatrice de RAG provoque une réponse normale anamnésique d'IgE.

(G) Impossibilité de provoquer des réactions anaphylactiques cutanées passives avec les conjugués d'OA-PEG et de RAG-PEG.

On étudie le caractère allergisant des conjugués d'OA-PEG chez le rat en utilisant la détermination par PCA. Pour cela on effectue une dilution en série au demi de 0,1 ml d'un sérum standard de souris ayant un titre connu en réagines déterminé par PCA (1.400) que l'on a produit par immunisation intrapéritonéale avec une dose sensibilisatrice de DNP-OA et on injecte par voie intradermique dans la peau rasée de rats non consanguins des volumes de 50  $\mu$ l de ces dilutions. Vingt-quatre heures après la sensibilisation cutanée, on injecte par voie intraveineuse aux différents rats 1,0 ml de solutions renfermant des quantités différentes d'OA non modifiée, d'OA-PEG<sub>6</sub> ou d'OA-PEG<sub>20</sub> et 0,5 % de bleu Evans (colorant). On tue les rats 30 minutes après et on détermine la réaction de PCA.

Comme le montre le tableau VIII, 1 mg d'OA non modifiée provoque une réaction de PCA forte et l'addition de PEG non conjugué ayant un poids moléculaire de 6.000 ou 20.000 à de l'OA ne gêne pas la réaction de PCA due à l'OA. Au contraire l'OA-PEG<sub>6</sub> et l'OA-PEG<sub>20</sub>, même lorsqu'on les injecte à des doses bien supérieures à celle de l'OA (c'est-à-dire respectivement 10 et 6 mg) ne provoquent pas une réaction significative. De plus les expériences 8 et 9 montrent que les animaux qui n'ont présenté aucune réaction de PCA après administration d'OA-PEG<sub>6</sub> ou d'OA-PEG<sub>20</sub>, présentent de bonnes réactions lorsqu'on leur réinjecte 1 mg d'OA non modifiée, 20 minutes après l'administration primaire des conjugués. Ces résultats indiquent que les conjugués d'OA-PEG ne sont pas capables in vivo de se combiner avec les anticorps IgE anti-OA et de les neutraliser. D'après ces interprétations, la réaction de PCA minime (titre de l'ordre de 60) observée dans l'expérience 5 avec une dose de 10 mg d'OA-PEG<sub>6</sub> peut être considérée comme due à la présence, dans la préparation, d'OA-PEG<sub>6</sub> utilisé pour l'épreuve, de très petites quantités d'OA non modifiée ou de certains conjugués d'OA-PEG renfermant très peu de molécules de PEG par molécule d'OA et possédant donc encore certains déterminants antigéniques accessibles. A partir de tous ces résultats, on peut conclure que l'incapacité des conjugués de PEG et d'OA à déclencher une réaction de PCA ou à neutraliser les réagines anti-OA fixées aux sites cutanés sensibilisés, est due au fait que les déterminants antigéniques d'origine de l'OA sont,

soit inaccessibles, soit fortement altérés dans les conjugués d'OA-PEG.

On a examiné, comme précédemment décrit, la capacité du RAG-PEG<sub>20</sub> à provoquer des réactions de PCA en utilisant un sérum murin contenant des réagines anti-RAG pour sensibiliser la  
5 peau des rats. Pour effectuer l'injection d'épreuve des sites cutanés sensibilisés on injecte par voie intraveineuse aux rats une solution de RAG ou de RAG-PEG<sub>20</sub> (en présence de bleu Evans). Les résultats de ces tests de PCA sont résumés dans le tableau IX et  
10 on peut conclure que les allergènes de jacobée non modifiés (RAG) provoquent une réaction de PCA énergique tandis que le RAG-PEG<sub>20</sub> ne provoque aucune réaction de PCA. De plus le résultat de la dernière expérience figurant dans ce tableau montre que l'administration de RAG-PEG<sub>20</sub> ne gêne pas la production d'une réaction  
15 de PCA lorsqu'on réinjecte aux animaux du RAG non modifié, 20 minutes après. On peut donc conclure que le conjugué RAG-PEG<sub>20</sub> ne possède pas de déterminants antigéniques facilement accessibles communs aux allergènes non modifiés de jacobée et qu'il est donc incapable d'avoir un effet déclenchant sur les mastocytes recou-  
20 verts d'anticorps IgE anti-RAG.

(H) Impossibilité pour les conjugués OA-PEG de provoquer une anaphylaxie chez les rats sensibilisés par l'OA.

Les expériences décrites ci-après ont été conçues pour confirmer l'impossibilité des conjugués d'OA-PEG à se combiner in  
25 vivo avec les anticorps IgE anti-OA. Comme les souris sont réfractaires à l'histamine, l'injection de l'antigène sensibilisateur à des souris possédant des anticorps IgE contre l'antigène correspondant ne provoque pas d'anaphylaxie. Par conséquent on choisit, pour déterminer si les conjugués OA-PEG sont capables ou non de  
30 se combiner in vivo aux anticorps IgE anti-OA fixés aux mastocytes et de déclencher une réaction anaphylactique, des rats qui sont des animaux sujets à l'anaphylaxie. Pour cela on sensibilise par voie générale des rats Chester Beatty en les immunisant avec du DNP-OA comme précédemment décrit. Pour les réactions générales  
35 on administre par voie intraveineuse à chaque animal sensibilisé, 2 mg d'OA non modifiée, d'OA-PEG<sub>6</sub> ou d'OA-PEG<sub>20</sub> dans 1 ml de PBS, 6 heures après une saignée et on observe soigneusement les animaux pour rechercher les effets de ces composés. Tous les rats sensibilisés ayant reçu une injection intraveineuse d'OA meurent  
40 dans les 15 à 30 minutes de choc anaphylactique. Au contraire,

ni l'OA-PEG<sub>6</sub> ni l'OA-PEG<sub>20</sub> ne sont capables de provoquer une gêne visible quelconque après administration aux animaux sensibilisés. Ces résultats concordent avec ceux précédemment indiqués dans la section (G) et confirment de façon certaine que les antigènes mo-  
5 difiés par le PEG ne présentent pas in vivo d'interaction avec les anticorps IgE des animaux que l'on a soumis à une sensibilisation active et sont donc incapables de déclencher une réaction anaphylactique.

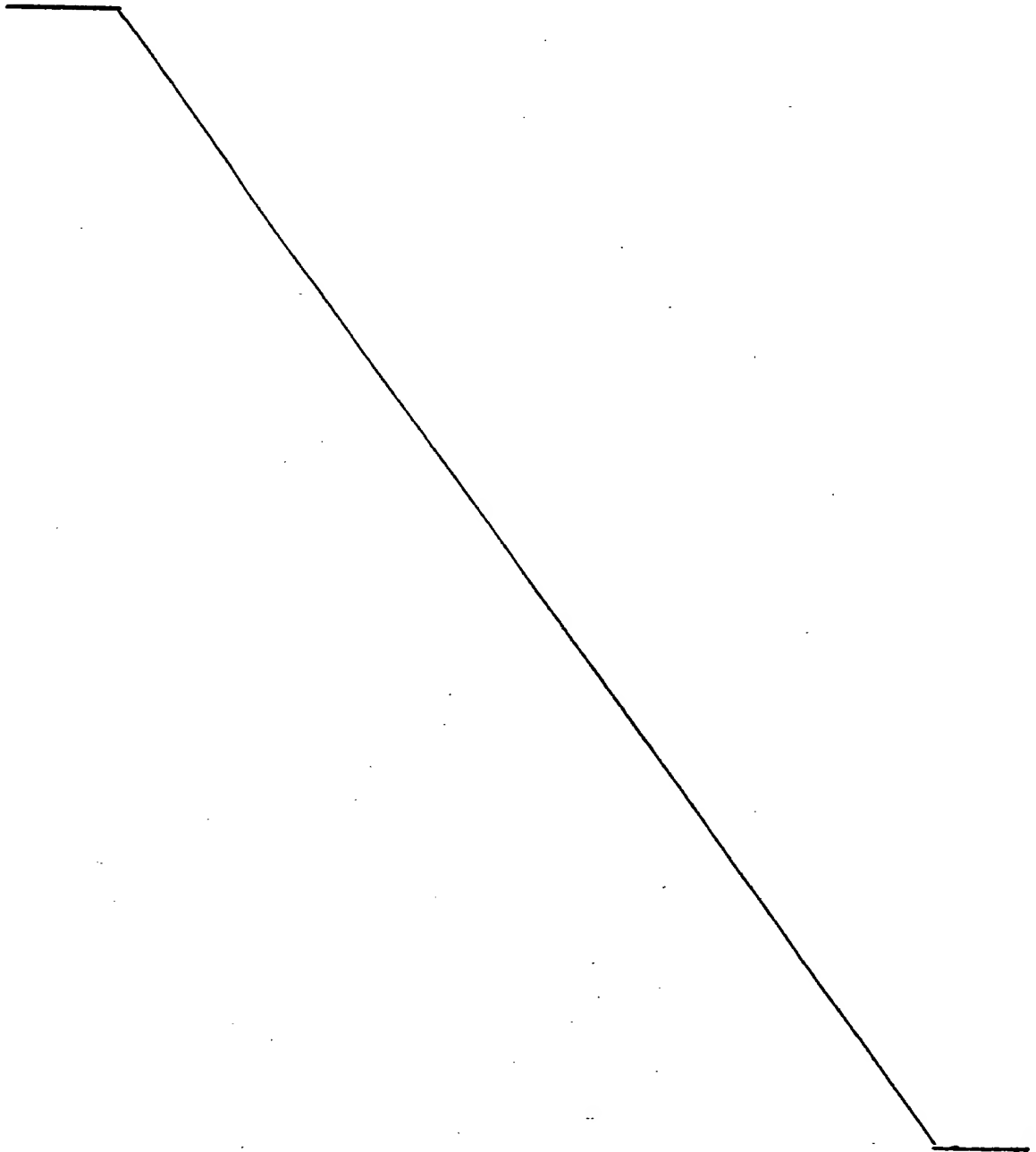




Tableau I - Impossibilité pour le PEG libre de supprimer les réponses de production de réagine

GROUPE	Traitement	Titres par PCA			
		Immunisation primaire		Immunisation secondaire	
	Jour 0 Jour 28	Jour ANTI-DNP	ANTI-OA	Jour ANTI-DNP	ANTI-OA
Témoin *	DNP-OA DNP-OA	14 3.470	2.090	35 930	1.620
				42 1.620	2.470
Essai A **	PEG <sub>6</sub> plus DNP-OA	14 3.470	1.600	35 1.400	1.400
				42 1.700	2.690
Essai B **	PEG <sub>20</sub> plus DNP-OA	14 2.620	1.410	35 980	1.660
				42 1.280	1.620

\* Les souris du groupe témoin reçoivent le jour zéro et le jour 28 une dose sensibilisatrice de DNP-OA.

\*\* Le jour zéro les souris des groupes d'essai A et B reçoivent 1 mg de PEG<sub>6</sub> ou de PEG<sub>20</sub> 4 heures avant l'administration de la dose sensibilisatrice de DNP-OA et le jour 28 uniquement une injection de la dose sensibilisatrice de DNP-OA.

Tableau II. Spécificité de l'immunosuppression avec les conjugués OA-PEG

GROUPE	Traitement	Titres par PCA					
		Immunsation primaire			Immunsation secondaire		
	Jour 0 Jour 28	Jour ANTI-DNP	ANTI-OA	ANTI-Asc	Jour ANTI-DNP	ANTI-OA	ANTI-Asc
Témoin A*	DNP-OA DNP-OA	14	1.000	1.000	N.T.†	35 3,310	3,500 N.T.
					42	1,280	3.020 N.T.
Essai A**	OA-PEG <sub>6</sub> DNP-OA plus DNP-OA	14	<10	<10	N.T.	35 80	480 N.T.
					42	480	860 N.T.
Témoin B*	DNP-Asc DNP-Asc	14	890	N.T.	200	35 1,000	N.T. 1,500
					42	640	N.T. 840
Essai B**	OA-PEG <sub>6</sub> DNP-Asc plus DNP-Asc	14	600	N.T.	180	35 1,650	N.T. 1,700
					42	780	N.T. 640

\* Les souris des groupes témoins A et B reçoivent respectivement les jours zéro et 28 une dose sensibilisatrice de DNP-OA ou 10 µg de DNP-Asc dans l'hydroxyde d'aluminium.

\*\* Les souris du groupe d'essai A reçoivent une injection intraveineuse de 800 µg d'OA-PEG<sub>6</sub> 4 heures avant l'administration de la dose sensibilisatrice de DNP-OA, le jour zéro, et une injection d'épreuve de la même dose de DNP-OA le jour 28.

\*\*\* Les souris du groupe d'essai B reçoivent une injection intraveineuse de 800 µg d'OA-PEG<sub>6</sub> 4 heures avant la sensibilisation avec 10 µg de DNP-Asc dans l'hydroxyde d'aluminium, le jour zéro, et une injection d'épreuve de la même dose de DNP-Asc le jour 28.

† N.T. = non testé.

Tableau III. Suppression par l'OA-PEG<sub>6</sub> d'une réponse de production de réagine en cours.

GROUPE	Traitement	Titres par PCA					
		Immunisation primaire			secondaire et tertiaire		
		Jour	Composé	Jour	ANTI-DNP	ANTI-OA	ANTI-OA
Témoïn	0		DNP-OA				
	36						
	40		DNP-OA				
	68		DNP-OA				
	47						
	54						
Essai	75						
	82						
	47						
	54						
	75						
	82						

Tableau IV. Suppression par l'OA-PEG<sub>20</sub> d'une réponse de production de réagine en cours.

GROUPE	Titres par PCA					
	Traitement		Immunsation primaire		Immunsation secondaire	
	Jour 0	Jour 22	Jour 28	Jour ANTI-DNP	Jour ANTI-OA	Jour ANTI-DNP ANTI-OA
Témoin	DNP-OA	Néant	DNP-OA			
			14	1.660	1.280	35 1.500 6.610
			21	850	1.660	42 5.120 5.120
			24	870	1.620	
Essai	DNP-OA	OA-PEG <sub>20</sub>	DNP-OA			
		(0,8 mg)	14	1.660	1.280	35 400 800
			21	850	1.660	42 700 800
			24	835	1.660	

Tableau V. Maintien de l'absence de réaction dans le transfert cellulaire adoptif.

GROUPE	Traitement des souris donneuses		Titres par PCA **		Titres par PCA ***	
	Jour 0	Jour 36	Jour	ANTI-DNP ANTI-OA	Jour	ANTI-DNP ANTI-OA
Témoin	DNP-OA	PBS	14	1.280	7	900
			36	850	14	1.280
			38	810		1.500
			41	810		1.950
Essai A	DNP-OA	OA-PEG <sub>6</sub> (0,2 mg)	14	1.280	7	40
			36	850	14	80
			38	710		320
			41	760		370
Essai B	DNP-OA	OA-PEG <sub>6</sub> (0,8 mg)	14	1.280	7	40
			36	850	14	60
			38	350		180
			41	400		270

\* On administre à tous les receveurs irradiés par les rayons X une dose sensibilisatrice de DNP-OA dans les 4 heures suivant le transfert de  $5 \times 10^7$  cellules spléniques du groupe approprié de donneurs.

\*\* Les titres de PCA de cette section du tableau concernent les teneurs des réagines des souris donneuses 14, 36, 38 et 41 jours après sensibilisation des souris.

\*\*\* Les titres de PCA de cette section du tableau concernent les teneurs des réagines des souris receveuses détectées 7 et 14 jours après le transfert adoptif.

Tableau VI. Effet des conjugués OA-PEG sur la réponse de production d'anticorps hémagglutinants.

GROUPE	Traitement*	Titres par HA** (LOG <sub>2</sub> )					
		Immunisation primaire			Immunisation secondaire		
	Jour 0	Jour	ANTI-DNP	ANTI-OA	Jour	ANTI-DNP	ANTI-OA
Témoin	DNP-OA	7 14	4 6	2 5	35 42	8 8	9 10
Essai A	OA-PEG <sub>6</sub> (0,2 mg) plus DNP-OA	7 14	4 4	2 6	35 42	7 7	9 10
Essai B	OA-PEG <sub>6</sub> (1,0 mg) plus DNP-OA	7 14	3 3	2 4	35 42	5 5	8 8
Essai C	OA-PEG <sub>20</sub> (0,2 mg) plus DNP-OA	7 14	5 6	1 5	35 42	8 7	9 11
Essai D	OA-PEG <sub>20</sub> (1,0 mg) plus DNP-OA	7 14	4 3	2 2	35 42	5 5	9 9

\* En plus du traitement indiqué le jour zéro, toutes les souris reçoivent une seconde injection sensibilisatrice de DNP-OA le jour 28.

\*\* On détermine les titres d'hémagglutination les jours 7, 14, 35 et 42 après la première sensibilisation des souris.

Tableau VII. Spécificité de l'immunosuppression avec le RAG-PEG<sub>6</sub>.

GROUPE	Traitement *			Titre par PCA des anti-RAG au Jour 41
	Jour 0	Jour 33	Jour 34	
Témoin I	RAG	PBS	RAG	480
Témoin II	RAG	RAG (500 µg)	RAG	560
Témoin III	RAG	OA-PEG <sub>6</sub> (500 µg)	RAG	500
Essai	RAG	RAG-PEG <sub>6</sub> (500 µg)	RAG	60

\* Tous les quatre groupes d'animaux reçoivent deux doses sensibilisatrices de RAG dans Al(OH)<sub>3</sub> les jours zéro et 34 et le jour 33 chaque groupe reçoit par voie intraveineuse le composé indiqué dans la troisième colonne, sans Al(OH)<sub>3</sub> et on détermine les réagines anti-RAG le jour 41.

Tableau VIII. Impossibilité pour les conjugués OA-PEG de provoquer des réactions de PCA\*

	Expérience No.	Composé uti- lisé pour l'épreuve	Quantité injectée (mg)	Titres par PCA
5	1	OA	1	1,400
	2	OA plus PEG <sub>6</sub> **	1  3	  1,500
10	3	OA plus PEG <sub>6</sub> **	1  3	  1,500
	4	OA-PEG <sub>6</sub>	1	<10
	5	OA-PEG <sub>6</sub>	10	60
15	6	OA-PEG <sub>20</sub>	1	<10
	7	OA-PEG <sub>20</sub>	6	<10
	8	OA-PEG <sub>6</sub> plus 20 min. après OA	1  1	  <10 960
20	9	OA-PEG <sub>20</sub> plus 20 min. après OA	1  1	  <10 900
25	* On sensibilise des rats non consanguins par voie intrader- mique avec un sérum de souris contenant des réagines anti- OA et on administre 24 heures après une injection intravei- neuse d'épreuve des composés indiqués dans la colonne 2, avec du bleu Evans dans du PBS.			
30	** On injecte les préparations de PEG <sub>6</sub> et de PEG <sub>20</sub> non conju- gués dans la même solution avec de l'OA en présence de bleu Evans.			



Tableau IX . Impossibilité pour les conjugués RAG-PEG de provoquer des réactions de PCA\*

Expérience No.	Composé utilisé pour l'épreuve	Quantité de composé (mg)	Titres par PCA
5	1 RAG	1	740
	2 RAG-PEG <sub>20</sub>	1	<10
	3 RAG-PEG <sub>20</sub> plus 20 min. après	1	<10
10	RAG	1	740

\* On sensibilise des rats non consanguins avec un sérum de souris contenant des réagines anti-RAG et 24 heures après on administre une injection intraveineuse d'épreuve du composé indiqué dans la colonne 2, en présence de bleu Evans.

### Exemple 3

On prépare, en utilisant le procédé à l'anhydride mixte, des conjugués d'albumine de chien (DA) et de monométhoxypolyéthylène glycols (m.PEG-OH) ayant des poids moléculaires différents.

20 Ce procédé comporte trois stades.

a) Préparation de m.PEG-O- $\underset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$

A une solution de 0,8 millimole de m.PEG-OH dans 20 ml de pyridine anhydre, on ajoute 800 mg (8 millimoles) d'anhydride succinique et on agite la solution combinée pendant une nuit à la température ordinaire. On chasse le solvant par évaporation sous vide. On dissout le résidu dans 15 ml de benzène et on précipite le produit en ajoutant 20 ml d'hexane préalablement refroidi. On recueille le précipité par filtration et on le dissout dans l'eau distillée. On dialyse la solution aqueuse contre de l'eau distillée dans des sacs de dialyse Quantipore<sup>®</sup> gamma (poids moléculaire de séparation : 4.000 ; fabriqués par Quantimetrix Co., Culver city, Californie) et on lyophilise finalement le produit.

b) Préparation de m.PEG-O- $\underset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}\underset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}\text{OCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$

- On dissout 0,4 millimole de m.PEG-O- $\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$  dans 10 ml de chloroforme. On maintient la température à 0°C avec un bain-marie glacé et on fait barboter de l'azote anhydre dans la solution. On ajoute 0,4 millimole de triéthylamine à la solution, puis on ajoute goutte à goutte 0,4 millimole de chloroformiate d'isobutyle. On maintient les solutions réactionnelles à 0°C pendant 30 minutes, puis on évapore sous vide à la température ordinaire. On lave le résidu plusieurs fois avec de l'éther de pétrole et on obtient un produit cristallin blanc.
- 10 c) Conjugaison de m.PEG-O- $\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}\text{CH}_2\text{CH}_2\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}\text{OCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$  à de l'albumine de chien

- On dissout 200 mg d'albumine de chien dans 30 ml de tampon borate à pH 9,6. On maintient la température à 0°C avec un bain-marie glacé. On ajoute par portions du m.PEG-O- $\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}\text{CH}_2\text{CH}_2\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}\text{OCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$  (en la quantité indiquée dans le tableau X) sous forme solide. On agite le mélange réactionnel pendant 3 heures à 0°C, puis on le conserve au réfrigérateur pendant 16 heures. On fait passer ensuite la solution réactionnelle sur une colonne de Sepharose<sup>®</sup> 6B. On recueille les fractions contenant des protéines et pas de dérivé de m.PEG libre et on les lyophilise. On détecte le m.PEG libre par chromatographie en couche mince.

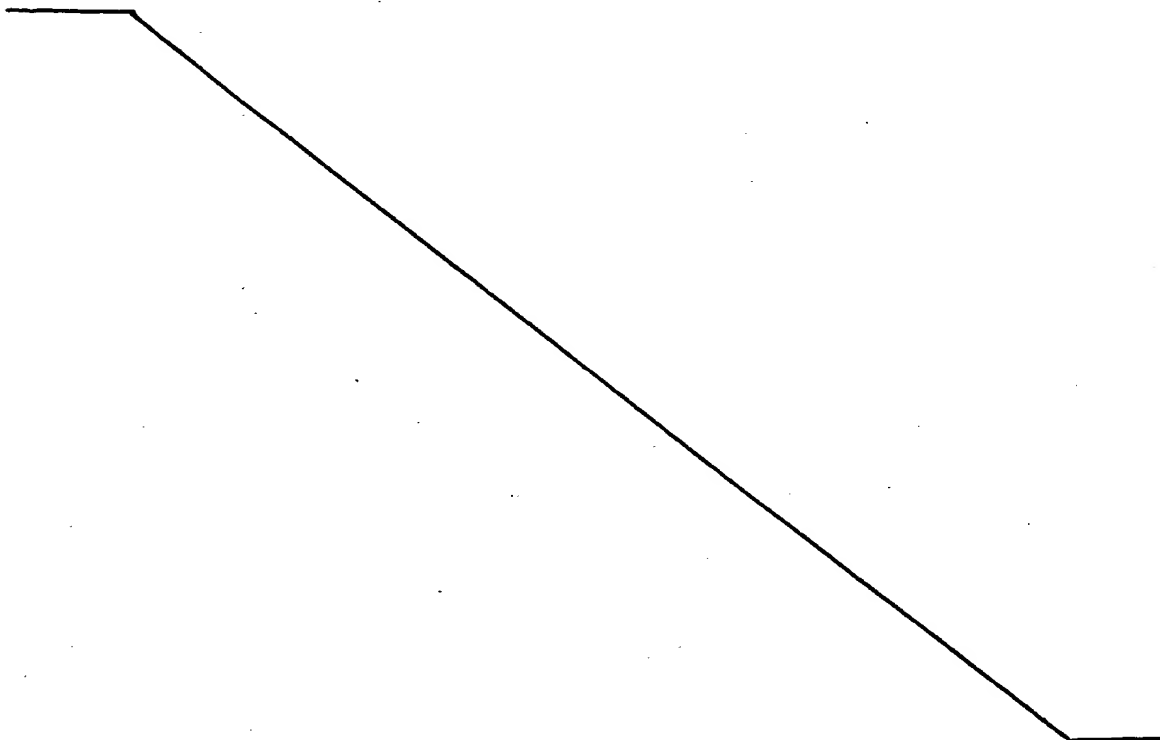


Tableau X

Substance No.	m. PEG-O-CCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OOH O Poids molécul. Quant (mg)		Quantité d'albumi- ne de chien (DA) (mg)	Conjugué Radicaux amino libres	Degré de conju- gaison PEG/DA
3a	2.000	200	200	50	13
3b	2.000	280	200	42	21
3c	2.000	1.000	200	23	36
3d	3.500	500	200	54	9
3e	3.500	870	200	45	15
3f	3.500	1.750	200	29	33
3g	3.500	2.500	200	23	35

On détermine le degré de conjugaison en évaluant la quantité des substituants de type m.PEG de l'albumine de chien modifiée par résonance magnétique nucléaire. On détermine le nombre de radicaux amino libres par la méthode à l'o-phthalaldéhyde (A.R.Torres et coll, Biochim.Biophys.Acta Vol. 434 (1976) p.209). Dans le tableau X le degré de conjugaison est exprimé par le nombre de molécules de PEG par molécule de DA.

On étudie le caractère allergisant, la tolérogénicité et l'antigénicité des conjugués ainsi préparés et les résultats figurent dans le tableau XI ci-après.

On détermine la tolérogénicité selon les procédés précédemment décrits et le degré de tolérogénicité correspond à la diminution moyenne des titres d'IgE après la troisième sensibilisation par rapport aux titres des animaux témoins qui n'ont reçu que les trois doses sensibilisatrices de DA. Une diminution d'un facteur de 6 à 100 correspond à une bonne tolérogénicité.

On détermine le caractère allergisant selon deux procédés, un procédé de type RAST (reaginic antibody response test ou test de réponse des réagines) et un test de neutralisation de type PCA.

Dans le procédé de type RAST (voir Yman et coll, Int. WHOIABS Sump. on standardisation and control of allergens administered to man, Genève, 1974; Develop.biol.standard. Vol.29, pp. 151-165 (Karger, Bâle, 1975), les allergènes modifiés réagissent avec un sérum contenant de l'IgE spécifique à l'allergène. L'excès d'IgE réagit avec les allergènes non modifiés couplés par covalence à un disque de papier. On ajoute pour former un complexe des anticorps à marquage radio-actif dirigés contre l'IgE. On mesure la radio-activité de ce complexe avec un compteur gamma. Le comptage est directement proportionnel à l'excès d'IgE du sérum après la réaction avec l'extrait (voir la référence ci-dessus). On exprime l'activité allergisante de l'allergène modifié par le pourcentage de l'activité de l'albumine de chien d'origine (=100%).

On détermine l'antigénicité des allergènes modifiés par immunodiffusion radiale unique inversée. On provoque chez des lapins la formation de titres élevés d'antisérum dirigé contre les allergènes non modifiés. On compare la formation de précipités spécifiques à différentes concentrations des allergènes incorporés à de l'agarose dans des boîtes de Pétri. On calcule l'activité relative à partir de la concentration minimale des allergènes

modifiés produisant une précipitation nette, en utilisant des concentrations minimales des allergènes non modifiés produisant un précipité comme standards. L'antigénicité de l'albumine de chien est choisie comme 100 % d'activité.

5

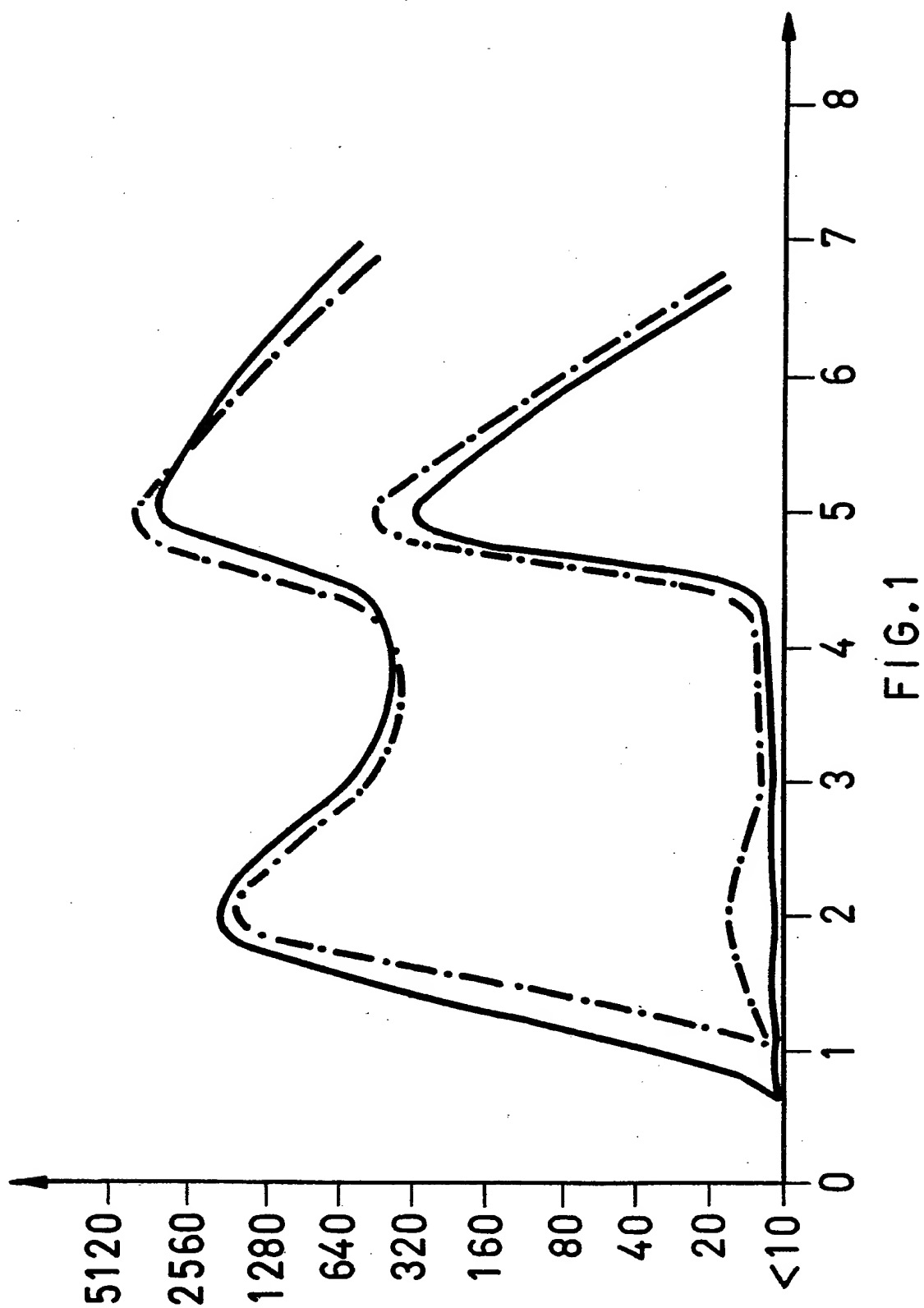
Tableau XI

Substance No.	Allergénicité		Antigénité % de DA	Toléro- géné- cité
	RAST % de DA	% neutralisa- tion de PCA		
3a	64	80	100	30
3b	21	30	50	20
3c	< 3	0	< 6	2
3d	77	90	50	30
3e	< 10	60	25	30
3f	< 5	0	< 6	20
3g	< 2	0	< 6	2
DA	100	100	100	50

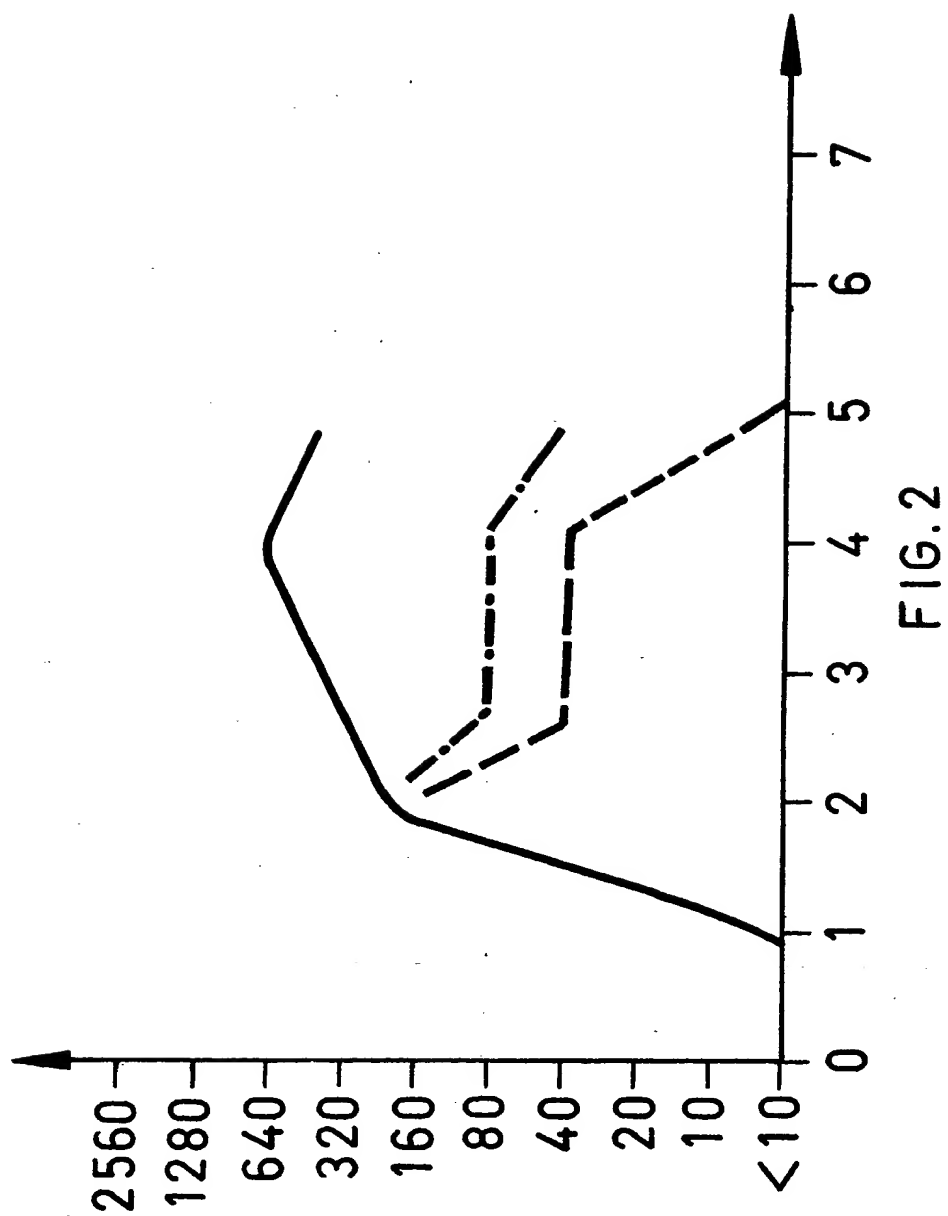
REVENDEICATIONS

1. Substances contenant des allergènes utiles comme suppres-  
seurs immunospcifiques de la production des réagines dirigées  
contre l'allergène en question, caractérisées en ce qu'elles con-  
sistent en des conjugués covalents des molécules d'allergène et  
de polymères non immunogènes solubles dans l'eau, le degré de  
conjugaison étant tel que les conjugués soient rendus tolérogènes  
ainsi que pratiquement non allergisants et non immunogènes.
2. Substances contenant des allergènes selon la revendication  
1, caractérisées en ce que le polymère est un polyéthylèneglycol  
ayant un poids moléculaire d'environ 2.000 à environ 35.000.
3. Substances contenant des allergènes selon la revendication  
1, caractérisées en ce qu'on choisit le polymère parmi les alcools  
polyvinyliques, les polyvinylpyrrolidones, les polyacrylamides et  
les homopolymères des amino-acides.
4. Procédé pour préparer des substances contenant des aller-  
gènes utiles comme immunosuppresseurs spécifiques de la production  
des réagines dirigées contre les allergènes en question, caracté-  
risé en ce qu'on unit par covalence des polymères non immunogènes  
solubles dans l'eau aux molécules d'allergène dans une mesure tel-  
le que les conjugués obtenus soient rendus tolérogènes ainsi que  
pratiquement non allergisants et non immunogènes.
5. Procédé pour préparer des substances contenant des aller-  
gènes selon la revendication 4, caractérisé en ce que le polymère  
est un polyéthylèneglycol ayant un poids moléculaire d'environ  
2.000 à 35.000.
6. Procédé pour préparer des substances contenant des aller-  
gènes selon la revendication 4, caractérisé en ce qu'on choisit  
le polymère parmi les alcools polyvinyliques, les polyvinylpyrro-  
lidones, les polyacrylamides et les homopolymères des amino-acides.
7. Médicament caractérisé par le fait qu'il contient, en  
tant que substances actives une quantité efficace d'une substance  
consistant en des conjugués covalents des molécules d'allergène  
et de polymères non immunogènes solubles dans l'eau, le degré de  
conjugaison étant tel que les conjugués soient rendus tolérogènes  
ainsi que pratiquement non allergisants et non immunogènes.
8. Médicament selon la revendication 7, caractérisé par le  
fait que le polymère constitutif du conjugué covalent de molécules  
d'allergène et de polymères est un polyéthylèneglycol ayant un  
poids moléculaire d'environ 2.000 à environ 35.000.

9. Médicament supprimeur immunospécifique de la production de réagines, caractérisé par le fait qu'il contient en tant que substances actives celles du médicament selon l'une des revendications 7 et 8.







**THIS PAGE BLANK (USPTO)**